

DOI 10.29254/2077-4214-2022-2-2-165-22-31

UDC 616.314.17-002.1-091.8-085.361-092.9

**Bigulyak H. T., Klishch I. M.****CHANGES IN THE STRUCTURE OF PERIODONTAL COMPONENTS IN THE MODELING OF ACUTE PERIODONTITIS IN RATS AND ITS CORRECTION BY STEM CELLS****I. Horbachevsky Ternopil National Medical University (Ternopil, Ukraine)****bigulyak@tdmu.edu.ua**

*Periodontal disease is an urgent problem of modern dentistry and is the second most common after caries. In modern periodontology, importance is given to agents that stimulate the regenerative potential of periodontal tissues, especially bone tissue. Our study aimed to determine the morphological changes features in periodontal components in the acute periodontitis modeling and its correction using stem cells. Acute periodontitis was simulated by introducing lipopolysaccharide into gum tissue in 40 microliters (1 mg/ml) every other day for 14 days. Stem cells were injected into the gums in a single injection at 1 million cells per 1 kg of body weight. Studies have shown that the use of correction methods with human mesenchymal stem cells and rat muscle stem cells had a positive effect on the simulated pathological process. The morphological changes characteristic of periodontitis were gradually reduced; namely, the normal blood supply to the tissues was restored, the arteries were less full-blooded, and the tonus of their walls decreased. The following conclusions were established:*

1. *In the experimental acute periodontitis reproduction, there are destructive changes in the epithelium and connective tissue stroma, impaired blood flow, and an inflammatory reaction in the gum tissue.*

2. *The use of correction methods with human mesenchymal stem cells and rat muscle stem cells had a positive effect on the course of the simulated pathological process.*

**Key words:** acute experimental periodontitis, stem cells, regeneration.

**Relationship of the publication with the planned research works.** The work is a fragment of the planned research of **I. Horbachevsky Ternopil National Medical University** Ministry of Health of Ukraine «Development and application of new methods of diagnosis, prevention and treatment of dental and periodontal diseases in people of all ages.» № state registration 0120U104149.

**Introduction.** Periodontal disease is an urgent problem in modern dentistry and is the second most common after caries [1, 2, 3]. The current knowledge level allows us to consider the periodontal disease etiopathogenesis as a multifactorial model, including microbial invasion (bacterial periodontal pathogens), the inadequate protective immune system response, and the impact of negative local factors on the oral cavity [4, 5].

In current conditions, due to the deteriorating environmental situation, malnutrition, and chronic stress, the development and course of inflammatory periodontal disease in different age groups have become medical and social significance [2]. The urgency and importance of the problem are determined by the steady increase in morbidity, untimeliness of early diagnosis, refractory process course, significant difficulties in achieving sustainable remission, and close connection with the general human body condition, etc. [6].

In modern periodontology, importance is given to the agents that stimulate the regenerative potential of periodontal tissues, especially bone [7, 8, 9]. Given this, the growing study importance of mesenchymal stem cells for the periodontal disease treatment. Such treatments are promising for more effective recovery of lost bone tissue in various diseases, especially periodontal tissues [10, 11].

**The aim** is to determine the morphological changes features in the periodontium components in the acute

periodontitis modeling and its correction using stem cells.

**Object and methods of research.** The study was performed on white outbred male rats weighing 180-200 g, obtained from the TNMU vivarium, by the requirements of the “Rules of work with experimental animals” [12]. The animals were on a complete vivarium diet with free access to water. The effectiveness of stem cell correction was studied in a periodontitis model caused by introducing lipopolysaccharide (LPS) into the gum tissue of 40 microliters (1 mg/ml) every other day for 14 days. On days 1, 7, 14, and 21 after the last LPS administration, rats were decapitated under thiopental anesthesia (50 mg/kg). Animals were divided into four groups: I – animals without simulated pathology (10 animals); II – animals with simulated acute periodontitis (10 animals); III – animals with periodontitis, which were corrected using human mesenchymal stem cells (10 animals); IV – animals with periodontitis, which were corrected using rat muscle stem cells (10 animals). In total, 40 animals were used.

Material for histological examination was obtained on the 1st, 7th, 14th, and 21st days after the animals' removal from the experiment by decapitation under thiopental anesthesia. The material for morphological studies was periodontal tissues.

The material was fixed in a 10% solution of buffered neutral formalin for histological examination. Further histological preparations were performed according to generally accepted methods [13]. For cytological examination, smears we Obtaining MSCs was performed in pregnant females approximately on the 21-24th day of pregnancy. After euthanasia using thiopental, umbilical cords were removed from the isolated fetus and washed from the blood with sterile HBSS buffer solution with the addition of 1% penicillin-streptomycin. Next,

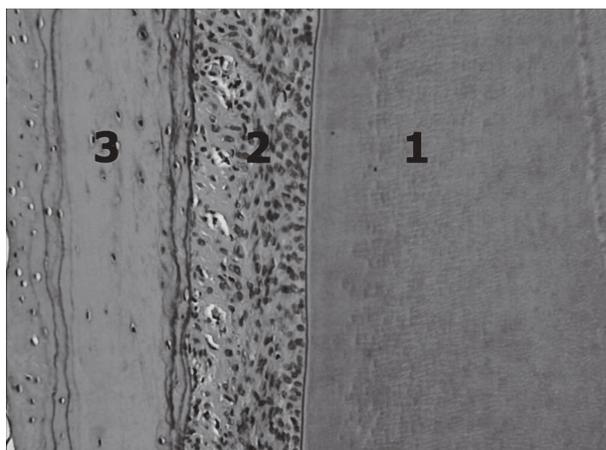


Figure 1 – Histological periodontium structure of an intact rat. Staining with hematoxylin and eosin. Mag.:  $\times 140$ . Marking: 1 – tooth tissue (cement), 2 – periodontal ligament, 3 – bone of the alveolar process of the jaw.

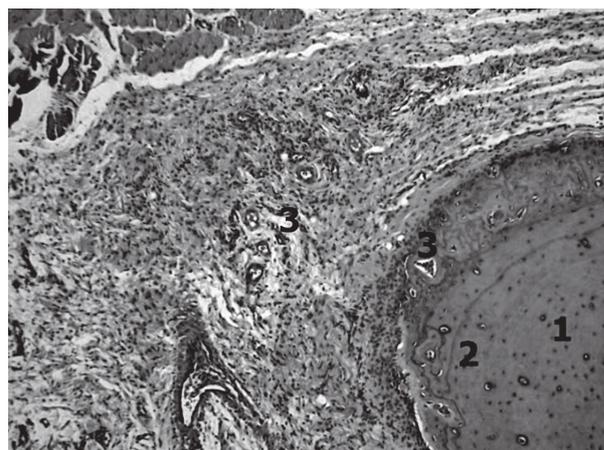


Figure 2 – Histological periodontium structure of an intact rat. Staining with hematoxylin and eosin. Mag.:  $\times 120$ . Marking: 1 – bone of the alveolar jaw process, 2 – intraosseous vessels, 3 – vessels of the soft periodontium tissues.

the enzyme method dissociated the cell mass and obtained viable MSCs. Cultivation was carried out in a  $CO_2$  incubator at a temperature of 37 C and a  $CO_2$  concentration of 5%. The conditioned medium was selected to introduce MSC from a culture vial with 90% MSC confluent, and the cells were washed with an HBSS buffer solution (Gibco).re stained according to Romanovsky-Gimza. For photo documentation, histological images were displayed on a computer monitor using a Nikon eclipse C microscope and a Digital Camera SCMOS using TouPWiev software at various magnifications. Tryple enzyme preparation (Gibco) was used to detach the cells from the culture vial bottom and incubated for 5 min at 37°C. The dissociating solution action was neutralized with a conditioned medium. Next, the cell suspension was transferred into a centrifuge tube and precipitated MSC for 8 min at 1700 rev/min. Next, the precipitate was dissolved in saline, and the resulting cell suspension was filtered through a sieve with a pore 100  $\mu m$  diameter and counted the isolated cells number using a hemocytometer using a vital dye – trypan blue. Rats were injected with stem cells into the gums at a single injection of 1 million cells per kg of body weight.

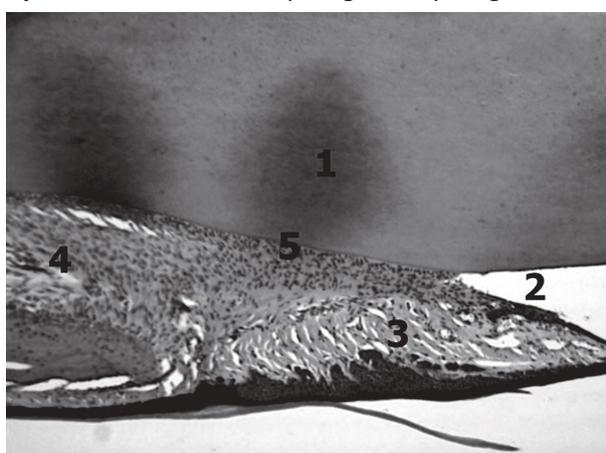


Figure 3 – Histological structure of rat periodontium after seven days of periodontitis modeling. Staining with hematoxylin and eosin. Mag.:  $\times 140$ . Marking: 1 – tooth tissue, 2 – formation of the periodontal pocket, 3 – submucosal edema, 4- edema and thickening of the periodontal ligament, 5 – polymorphocellular inflammatory infiltrate.

**Research results and their discussion.** In the analysis of histological sections made from pieces are taken from the oral cavity of rats intact and control groups and which were complex that included a tooth and surrounding tissues, a typical periodontal structure was found. The structure of such a complex is characterized by the presence of the tooth (cement, pulp chamber, and the pulp itself, represented by vessels and nerves), periodontal ligament (loose connective tissue permeated with collagen and elastic fibers), alveolar jaw bone and gingival mucosa (fig. 1).

The vascular bed is represented by small arteries and arterioles and individual structural components that are part of the hemomicrocirculatory tract. In the lumen of blood vessels, sometimes there are small clusters of blood cells (fig. 2).

In the periodontitis modeling on the 7th day of the experiment, mainly in soft tissues, clear inflammation signs were detected (fig. 3).

They were manifested primarily by dilation of blood vessels and their plethora, edema of both epithelium and subepithelial connective tissue, and the periodontal ligament, the thickness of which almost doubled. The gingival sulcus deepened and widened, forming a periodontal pocket. Focal polymorphocellular inflammatory infiltrates were observed in the periodontal ligament,

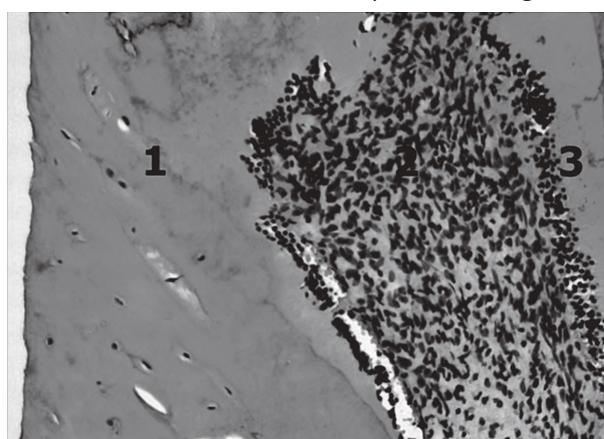


Figure 4 – Histological structure of rat periodontium after seven days of periodontitis modeling. Staining with hematoxylin and eosin. Mag.:  $\times 180$ . Marking: 1 – bone of the alveolar jaw process, 2 – polymorphic cellular inflammatory infiltrate with bone tissue destruction, 3 – inflammatory lymphocytic leukocyte roller.

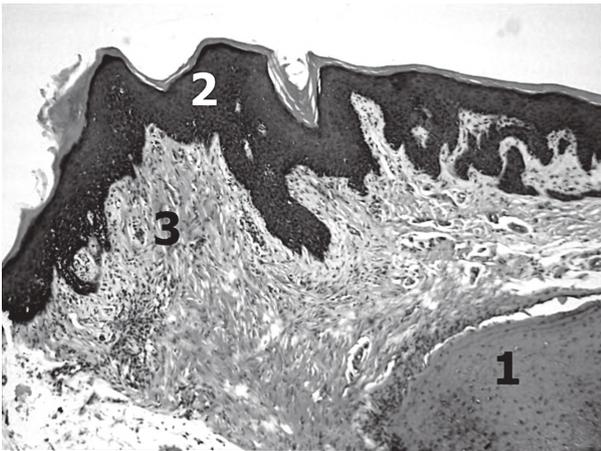


Figure 5 – Histological structure of rat periodontitis after 14 days of periodontitis modeling. Staining with hematoxylin and eosin. Mag.: ×140. Marking: 1 – bone of the alveolar jaw process, 2 – acanthosis of the epithelium, 3 – connective tissue growth.

especially in part directly adjacent to the gingival pocket. Infiltrates were sometimes found in the bone thickness of the alveolar jaw process with the formation of lympho-leukocyte roller around them and the destruction of bone tissue itself (fig. 4).

As the process progressed, the inflammatory manifestations intensified with the layering of destructive processes on them and the simultaneous development of compensatory changes. Destructive changes were manifested by a further detachment of the periodontal ligament, deepening of the periodontal pocket, and focal v alveolar bone resorption. In the epithelium, there were changes of dystrophic nature, which were manifested by its thinning of the oral cavity side, a decrease in cell size, and pyknosis of their nuclei. Compensatory manifestations were characterized by the granulation tissue growth in the gums with acanthosis foci of the epithelium with its thickening near the tooth and increasing its papillae size, which deepens into the underlying connective tissue as a result of proliferation. At the same time, there was an increase in connective tissue (fig. 5-6).

As for blood vessels, as the simulated pathology duration, the walls of their arteries thickened, and the lumen narrowed. Thickening of the artery walls occurred both due to edema and hypertrophy of the smooth muscle

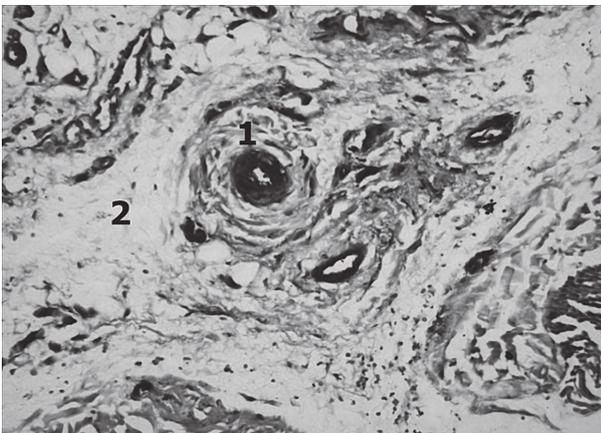


Figure 7 – Histological structure of rat periodontitis after 21 days of periodontitis modeling. Staining with hematoxylin and eosin. Mag.: × 180. Marking: 1 – artery with a thickened wall and narrowed lumen and fibrous adventitia, 2 – perivascular edema.



Figure 6 – Histological structure of rat periodontium after 21 days of periodontitis modeling. Staining with hematoxylin and eosin. Mag.: ×140. Marking: 1 – bone of the alveolar jaw process, 2 – resorption of the compact cortical part of the alveolar bone by osteoclasts, 3 – the spongy part destruction of the alveolar bone at the site of polymorphic cell infiltrates, 4 – tooth tissue, 5 – periodontal ligament.

cells, which was confirmed by an increase in their size. Such changes in the arteries aim to reduce the hemodynamic load on the hemomicrocirculatory tract. However, hemodynamic disorders led to the perivascular edema development, which was accompanied by thickening of the vessels' adventitia due to its defibering (fig. 7).

Occasionally there were arteries with particularly thickened walls, which resembled arteries of the “closing type,” which indicates their dynamic functional load under different hemodynamics conditions (fig. 8). Such arteries were characterized by subintimal located smooth muscle bundles of the longitudinal direction, i.e., the so-called “polypoid cushions,” which can have a particularly intense effect on the speed and volume of blood flow (fig. 8). It was possible to distinguish the bundles of longitudinal smooth muscle by the rounded shape of their nuclei sections. In a circular arrangement of fibers, their nuclei have a spindle-shaped form.

The use of correction methods using human mesenchymal stem cells positively affected the simulated pathological process course. The morphological changes that were characteristic of periodontitis were gradually reduced. That is, the standard blood supply to the tissues was restored. The arteries were less full-blooded,

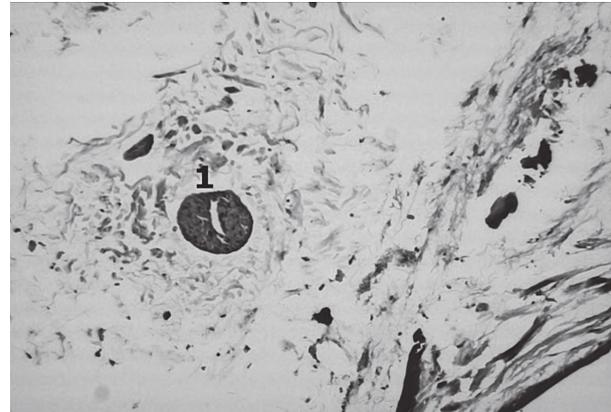


Figure 8 – Histological structure of rat periodontium after 21 days of periodontitis modeling. Staining with hematoxylin and eosin. Mag.: × 140. Marking: 1 – artery with a thickened wall and a narrowed lumen and a longitudinal bundle of subintimal located smooth muscle.



Figure 9 – Histological structure of rat periodontium after 14 days of application of rat mesenchymal stem cells on the background of modeling periodontitis. Staining with hematoxylin and eosin. Mag.: ×140. Marking: 1 – epithelium with partially preserved phenomena of acanthosis, 2 – connective tissue, 3 – periodontal ligament, 4 – tooth tissue.

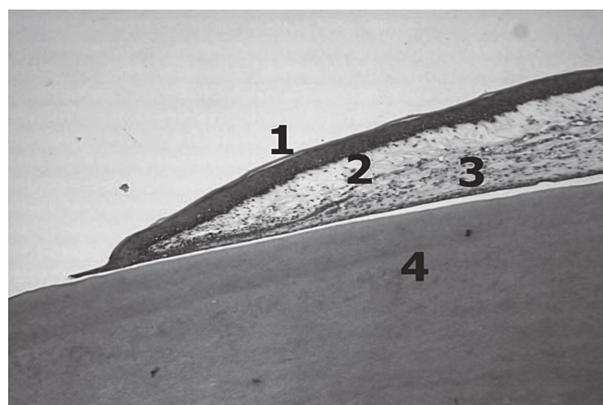


Figure 10 – Histological rat periodontitis structure after 21 days of human mesenchymal stem cells use in the background of modeling periodontitis. Staining with hematoxylin and eosin. Mag.: ×140. Marking: 1 – completely restored epithelium structure of the gingival mucosa, 2 – moderately pronounced connective tissue, 3 – the normal type of periodontal ligament, 4 – tooth tissue.

and their walls' tonus decreased. As a result, the tissue swelling gradually reduced, acquiring its original size. The areas of polymorphonuclear infiltration decreased and gradually disappeared. Due to osteoblasts, the bone structure of the alveolar jaw process was restored. The periodontal pocket size decreased, and even they closed entirely due to complete adhesion of the mucous gums membrane to the tooth, which rose its surface (fig. 9).

By the 21st day, the morphological organization of the structural periodontium components was more fully restored. Due to hyperplasia, the mucosa crawls on the tooth, often completely reducing periodontal pockets (fig. 10).

#### Conclusions.

In the experimental acute periodontitis reproduction, there are destructive epithelium changes and connective tissue stroma, impaired blood flow, there is an inflammatory reaction in the gum tissue.

The use of correction methods by human mesenchymal stem cells had a positive effect on the simulated pathological process: gradually reduced the morphological changes characteristic of periodontitis, restored normal blood supply to tissues, gradually decreased tissue edema, decreased and gradually disappeared fields of polymorphic cell infiltration. Due to osteoblasts, the bone structure of the alveolar jaw process was restored. The periodontal pocket size decreased, and in some cases, they closed completely due to complete adhesion of the mucous gums membrane to the tooth, which rose up by its surface.

**Prospects for further research.** In the future, it is planned to study the indicators of specific and nonspecific organism resistance in animals with acute periodontitis and stem cell correction.

#### References

- Hodovana OI. Zakhvoryuvannya parodontu (hinhivit, parodontyt, parodontoz). Dzhura; 2009. 200 s. [in Russian].
- Zabolotnyy TD, Borysenko AV, Pupin TI. Zapal'ni zakhvoryuvannya parodontaabolutnyy. HalDent; 2013. 205 s. [in Ukrainian].
- Guzman YA, Sakellari D, Arsenakis M, Floudas CA. Proteomics for the discovery of biomarkers and diagnosis of periodontitis: a critical review. Expert review of proteomics. 2014 Feb 1;11(1):31-41.
- Thumbigere'Math V, Michalowicz BS, Hodges JS, Tsai ML, Swenson KK, Rockwell L, et al. Periodontal disease as a risk factor for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. Journal of periodontology. 2014 Feb;85(2):226-33.
- Hrudyanov AY, Sysoeva VYu, Ternovoy YuV. Stvolovye kletky y vozmozhnosty ykh prymerenyya v parodontolohyy. Stomatolohyya. 2012;91(1):71-5. [in Russian].
- Zolotukhyna EL. Stvolovye kletky y perspektyvy ykh prymerenyya v stomatolohyy y chelyustnolytsevoy khyrurhyy. Molodoy uchenyy. 2014;9(6):145-7. [in Russian].
- Butenko HM, Kyryk VM. Reheneratyvna medytsyna i stovburovi klityny – problemy i rishennya. Zhurn. NAMN Ukrayiny. 2011;17(1):62-6. [in Ukrainian].
- Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morszeck C. Dental follicle stem cells and tissue engineering. Journal of oral science. 2010;52(4):541-52.
- Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. Journal of clinical periodontology. 1997 Sep;24(9):658-68.
- Guida L, Annunziata M, Carinci F, Di Feo A, Passaro I, Oliva A. In vitro biologic response of human bone marrow stromal cells to enamel matrix derivative. Journal of periodontology. 2007 Nov;78(11):2190-6.
- Renard E, Lopez-Cazaux S, Guicheux J, Weiss P, Laboux O, Alliot-Licht B. Stem cells of dental pulp. Comptes rendus biologies. 2007 Aug 13;330(9):635-43.
- Kozhem'yakin YuM, Khromov OS, Filonenko MA, Sayfetdinova HA. Naukovo-praktychni rekomendatsiyi z utrymannya laboratornykh tvaryn ta roboty z nymy. K.: Avitsena; 2002. 156 s. [in Ukrainian].
- Bahriy MM, Dibrova VA, Popadynets' OH, Hryshchuk IM. Metodyky morfolohichnykh doslidzhen': monohrafiya. Vinnytsya: Nova knyha; 2016. 238 s. [in Ukrainian].

#### ЗМІНИ СТРУКТУРИ КОМПОНЕНТІВ ПАРОДОНТА ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ГОСТРОГО ПАРОДОНТИТУ У ЩУРІВ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ

Бігуляк Г. Т., Кліщ І. М.

**Резюме.** Метою нашого дослідження було визначення особливостей морфологічних змін компонентів пародонту при змодельованому гострому періодонтиті та його корекція стовбуровими клітинами.

Проаналізовано результати гістологічного дослідження тканин пародонту тварин з гострим експериментальним пародонтитом, який коригували за допомогою мезенхімальних стовбурових клітин людини. Залежно від лікування тварин поділили на 4 групи: 1 група – тварини без патології (інтактні); 2-й – тварини з змодельованим гострим пародонтитом; 3-й – тварини з пародонтитом, коригованим мезенхімальними стовбуровими клітинами. Матеріал для гістологічного дослідження отримували на 1-шу, 7-му, 14-ту та 21-шу доби після виведення тварин з експерименту. Матеріалом для морфологічних досліджень були тканини пародонта. Для цитологічного дослідження мазки відбитки фарбували за Романовським-Гімзою. Для фотодокументації зображення з гістологічних препаратів виводили на монітор комп'ютера за допомогою мікроскопа Nikon eclipse C та цифрової відеокамери (Digital Camera SCMOS) за допомогою програмного забезпечення ToupWiev. За результатами дослідження встановлено, що при експериментальному моделюванні гострого періодонтиту були присутні деструктивні зміни в епітелії та стромі сполучної тканини, порушення кровотоку, запальна реакція в тканині ясен. Корекція мезенхімальними стовбуровими клітинами позитивно впливає на перебіг змодельованого патологічного процесу. Морфологічні зміни, характерні для пародонтиту, поступово зменшувалися, тобто відновлювалося нормальне кровопостачання тканин, артерії були менш повнокровними, тунс їх стінок знижувався. Внаслідок цього набряк тканин поступово зменшувався, набуваючи початкових розмірів. Поля поліморфно-ядерної інфільтрації зменшувалися і поступово зникали. Остеобласти сприяли відновленню кісткової структури альвеолярного відростка щелепи. Розмір пародонтальної кишені зменшився, а на окремих ділянках він повністю закритися в результаті повного зчеплення слизової оболонки ясен із зубом, який піднімався його поверхнею догори.

**Ключові слова:** гострий експериментальний періодонтит, стовбурові клітини, регенерація.

### CHANGES IN THE STRUCTURE OF PERIODONTAL COMPONENTS IN THE MODELING OF ACUTE PERIODONTITIS IN RATS AND ITS CORRECTION BY STEM CELLS

**Biguliak H. T., Klishch I. M.**

**Abstract.** The aim of our research was to study peculiar features of morphological changes in the components of the periodontium in the modelled acute periodontitis and its correction by stem cells. The results of histological study of periodontal tissues of the animals with acute experimental periodontitis, which was corrected using human mesenchymal stem cells were analysed. Depending on the treatment, the animals were divided into 4 groups: the 1<sup>st</sup> group – the animals without pathology (intact); the 2<sup>nd</sup> – the animals with modelled acute periodontitis; the 3<sup>rd</sup> – the animals with periodontitis corrected by human mesenchymal stem cells. The material for histological study was obtained on the 1<sup>st</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days after taking the animals out of the experiment. Periodontal tissues of the animals were used as the material for morphological studies. For photo documentation, the images of histological specimens were displayed on a computer monitor using a Nikon Eclipse C microscope and a SCMOS Digital Camera by means of ToupWiev. In the experimental modelling of acute periodontitis the destructive changes in the epithelium and connective tissue stroma, impaired blood flow, inflammatory response in the gum tissue were present. According to the results of the research, it was established that correction by human mesenchymal stem cells positive effect on a course of the modeled pathological process. The morphological changes characteristic of periodontitis gradually reduced, i.e. the normal blood supply to the tissues restored, the arteries were less full-blooded, the tone of their walls decreased. Consequently, the swelling of the tissues gradually decreased becoming of original size. The polymorphonuclear infiltration fields decreased and gradually disappeared. Osteoblasts promoted restoration of the bone structure of the jaw alveolar process. The size of the periodontal pocket decreased, and in some areas it fully closed as a result of complete adhesion of the mucous membrane of the gums to the tooth, which rose on its surface upwards.

**Key words:** acute experimental periodontitis, stem cells, regeneration.

#### ORCID and contributionship:

Biguliak H. T.: 0000-0002-2137-4859 <sup>BCDE</sup>

Klishch I. M.: 0000-0001-6226-4296 <sup>AF</sup>

#### Conflict of interest:

The Authors declare no conflict of interest.

#### Corresponding author

Biguliak Halyna Teodorivna

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University

Ukraine, 46001, Ternopil, 1 Maydan Voli str.

Tel: 0987515333

E-mail: bigulyak@tdmu.edu.ua

**A** – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article.

Received 01.12.2021

Accepted 07.05.2022

**ЗМІНИ СТРУКТУРИ КОМПОНЕНТІВ ПАРОДОНТА ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ГОСТРОГО ПАРОДОНТИТУ У ЩУРІВ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ****Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України  
(м. Тернопіль, Україна)**

bigulyak@tdmu.edu.ua

*Захворювання пародонта є актуальною проблемою сучасної стоматології та за частотою посідають друге місце після карієсу. У сучасній пародонтології важливе значення відводиться застосуванню засобів, що стимулюють регенераторний потенціал тканин пародонта, особливо кісткової тканини. Метою нашого дослідження було визначити особливості морфологічних змін у компонентах пародонта при моделюванні гострого пародонтиту та його корекції з використанням стовбурових клітин. Гострий пародонтит моделювали введенням ліпополісахариду в тканини ясен по 40 мікролітрів (1мг/мл) через день протягом 14-ти діб. Стовбурові клітини вводили в ділянку ясен разовою ін'єкцією з розрахунку 1 млн клітин на 1 кг маси тіла. У результаті проведених досліджень встановлено, що застосування методів корекції з використанням мезенхімальних стовбурових клітин людини, а також м'язових стовбурових клітин щура мало позитивний вплив на перебіг модельованого патологічного процесу. Поступово редукувалися ті морфологічні зміни, які були характерними для пародонтиту, а саме відновлювалося нормальне кровопостачання тканин, артерії були менш повнокровними, знижувався тонус їх стінок. Було встановлено такі висновки:*

*1. При експериментальному відтворенні гострого пародонтиту мають місце деструктивні зміни епітелію та сполучнотканинної стромы, порушення кровоплину, спостерігається запальна реакція в тканині ясен.*

*2. Застосування методів корекції з використанням мезенхімальних стовбурових клітин людини, а також м'язових стовбурових клітин щура мало позитивний вплив на перебіг модельованого патологічного процесу.*

**Ключові слова:** гострий експериментальний пародонтит, стовбурові клітини, регенерація.

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Робота є фрагментом планової НДР Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України «Розробка та застосування нових методів діагностики, профілактики та лікування захворювань зубів та пародонта у осіб різного віку», № державної реєстрації 0120U104149.

**Вступ.** Захворювання пародонта є актуальною проблемою сучасної стоматології та за частотою посідають друге місце після карієсу [1, 2, 3]. Сучасний рівень знань дозволяє розглядати етіопатогенез захворювань пародонта як мультифакторну модель, що включає наявність мікробної інвазії (бактерійні пародонтопатогени), неадекватну захисну реакцію імунної системи, вплив негативних місцевих факторів порожнини рота [4, 5].

В сучасних умовах, внаслідок погіршення екологічної ситуації, нераціонального харчування, хронічного стресу розвиток та перебіг запальних захворювань пародонта в різних вікових групах населення набувають не тільки медичної, а й соціальної значимості [2]. Актуальність та важливість проблеми визначається неухильним зростанням захворюваності, несвоєчасністю ранньої діагностики, рефрактерним перебігом процесу, значними труднощами в досягненні стійкої ремісії, наявністю тісного зв'язку із загальним станом організму людини тощо [6].

У сучасній пародонтології важливе значення відводиться застосуванню засобів, що стимулюють регенераторний потенціал тканин пародонта, особливо кісткової тканини [7, 8, 9]. Враховуючи це, зростає важливість дослідження саме мезенхімальних стовбурових клітин для лікування патології пародонта.

Такі методи лікування є перспективними для більш ефективного відновлення втраченої кісткової тканини при різних захворюваннях, особливо тканин пародонта [10, 11].

**Мета** – визначити особливості морфологічних змін у компонентах пародонта при моделюванні гострого пародонтиту та його корекції з використанням стовбурових клітин.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проводили на білих безпородних щурах-самцях масою тіла 180-200 г, отриманих з віварію ТНМУ, відповідно до вимог «Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин» [12]. Тварини знаходилися на повноцінному раціоні віварію з вільним доступом до води. Ефективність корекції з використанням стовбурових клітин вивчали на моделі пародонтиту, викликаного введенням ліпополісахариду (ЛПС) в тканини ясен по 40 мікролітрів (1мг/мл) через день протягом 14-ти діб. Через 1-ну, 7, 14 і 21-ну доби після останнього введення ЛПС щурів декапітували під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг). Тварин розподілили на 4 групи: I – тварини без змодельованої патології (10 тварин); II – тварини із змодельованим гострим пародонтитом (10 тварин); III – тварини з пародонтитом, яким проводили корекцію з використанням мезенхімальних стовбурових клітин людини (10 тварин); IV – тварини з пародонтитом, яким проводили корекцію із використанням м'язових стовбурових клітин щура (10 тварин). Загалом використано 40 тварин.

Матеріал для гістологічного дослідження отримували на 1-шу, 7-му, 14-ту та 21-шу доби після виведення тварин з експерименту шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом. Матеріалом для морфологічних досліджень були тканини пародонта.

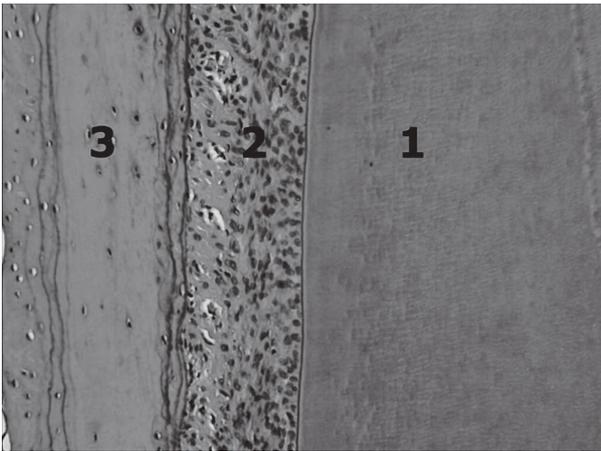


Рисунок 1 – Гістологічна будова пародонта інтактного щура. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.: x140. Позначення: 1 – тканина зуба (цемент), 2 – періодонтальна зв'язка, 3 – кістка альвеолярного відростка щелепи.

Для проведення гістологічного дослідження матеріал фіксували в 10%-му розчині забуференого нейтрального формаліну. Подальше проведення гістологічних препаратів здійснювалося згідно загальноприйнятих методик [13]. Для цитологічного дослідження мазки відбитки фарбували за Романовським-Гімзою. Для фотодокументації зображення з гістологічних препаратів виводили на монітор комп'ютера за допомогою мікроскопа Nikon eclipse C та цифрової відеокамери (Digital Camera SCMO5) за допомогою програмного забезпечення TourWiev при різних збільшеннях.

Отримання МСК проводили у вагітних самок, орієнтовно на 21-24-ту добу вагітності. Після евтаназії з використанням тіопенталу із виділених плодів забирали пуповинні канатики, відмивали їх від крові стерильним буферним розчином HBSS з додаванням 1% пеніциліну-стрептоміцину. Далі для дисоціації клітинної маси та отримання життєздатних МСК використовували ферментний метод. Культивування здійснювали в CO<sub>2</sub> інкубаторі за температури 37 С та концентрації CO<sub>2</sub> – 5%. Для уведення МСК з культурального флакона з 90% конфлюентом МСК відбирали кондиційне середовище і промивали клітини буферним розчином HBSS (Gibco). Для відкріплення клітин від дна культу-

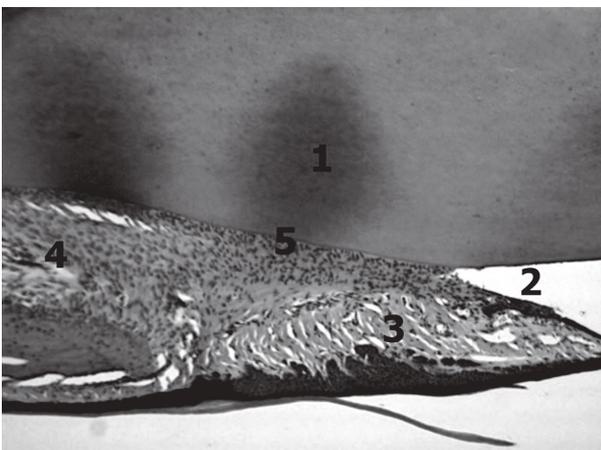


Рисунок 3 – Гістологічна будова пародонта щура через 7 днів моделювання пародонтиту. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.:x140. Позначення: 1 – тканина зуба, 2- формування пародонтальної кишені, 3 – набряк підслизової, 4- набряк і потовщення періодонтальної зв'язки, 5 – поліморфоклітинний запальний інфільтрат.

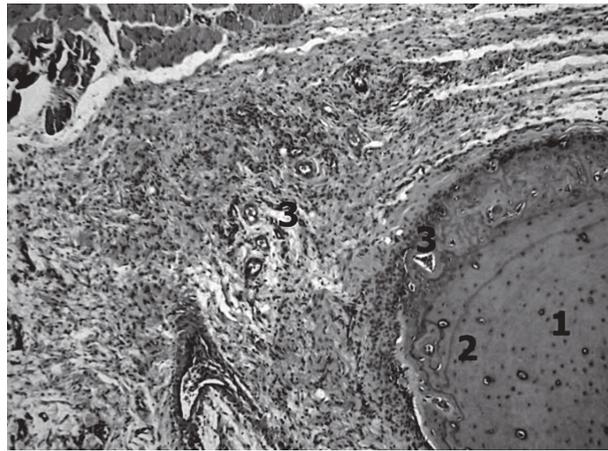


Рисунок 2 – Гістологічна будова пародонта інтактного щура. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.:x120. Позначення: 1 – кістка альвеолярного відростка щелепи, 2 – внутрішньокісткові судини, 3 – судини м'яких тканин пародонта.

рального флакону використовували ферментний препарат Tryple (Gibco) та інкубували 5 хв при 37°C. Дію дисоціюючого розчину нейтралізували кондиційним середовищем. Далі клітинну суспензію переносили у центрифужну пробірку і осаджували МСК впродовж 8 хв при 1700 об/хв. Далі осад розчиняли у фізрозчині, отриману клітинну суспензію профільтровували через сито з діаметром пор 100 мкм і підраховували кількість виділених клітин за допомогою гемоцитометра з використанням вітального барвника – трипанового синього. Щурам вводили стовбурові клітини в ділянку ясен разовою ін'єкцією з розрахунку 1 млн клітин на 1 кг маси тіла.

**Результати дослідження та їх обговорення.** При аналізі гістологічних зрізів, зроблених із шматочків, що були забрані з ротової порожнини інтактних та контрольної групи щурів і які являли собою комплекс, що включав у свій склад зуб та оточуючі його тканини було встановлено типову будову пародонта. Для будови такого комплексу характерна наявність самого зуба (цемент, пульпова камера і сама пульпа, представлена судинами і нервами), періодонтальна зв'язка (пухка сполучна тканина, пронизана колагеновими і еластичними волокнами), кістка альвеолярного відростка щелепи і слизова оболонка ясен (рис. 1).

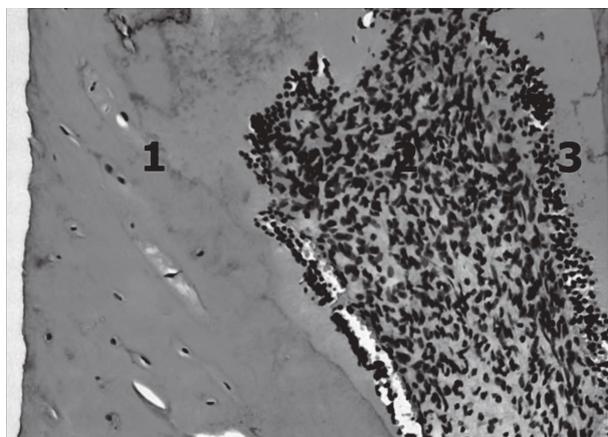


Рисунок 4 – Гістологічна будова пародонта щура через 7 днів моделювання пародонтиту. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.:x180. Позначення: 1 – кістка альвеолярного відростка щелепи, 2 – поліморфоклітинний запальний інфільтрат з деструкцією кісткової тканини, 3 – запальний лімфо-лейкоцитарний валик.

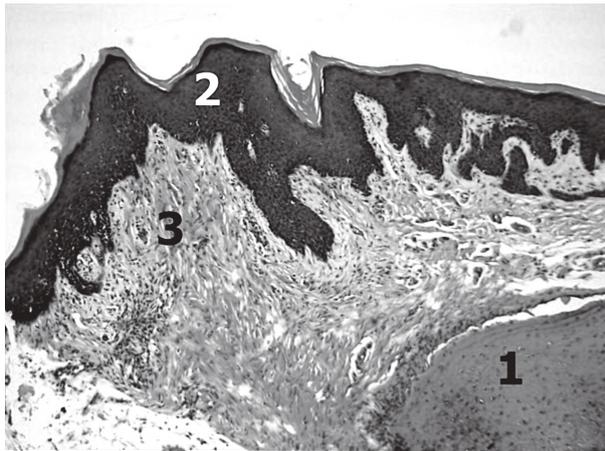


Рисунок 5 – Гістологічна будова пародонта щура через 14 днів моделювання пародонтиту. Забарвлення гематоксилином і еозиним. Зб.: ×140. Позначення: 1 – кістка альвеолярного відростка щелепи, 2 – акантоз епітелію, 3 – розростання сполучної тканини.

Кровоносне судинне русло представлене дрібними артеріями і артеріолами, а також окремими структурними компонентами, які входять до складу гемомікроциркуляторного русла. У просвіті судин іноді зустрічаються невеликі скупчення формених елементів крові (рис. 2).

При моделюванні пародонтиту вже на 7-му добу експерименту переважно у м'яких тканинах визначалися чіткі ознаки запального характеру (рис. 3).

Вони проявлялися, у першу чергу, розширенням просвіту кровоносних судин і їх повнокров'ям, набряком як епітелію, так і підепітеліальної сполучної тканини, а також періодонтальної зв'язки, товщина якої збільшувалася майже вдвічі. Поглиблювалася і розширювалася ясенна борозна, формуючи пародонтальну кишеню. У періодонтальній зв'язці, особливо у тій її частині, що безпосередньо прилягала до ясенної кишені, спостерігалися вогнищеві поліморфноклітинні запальні інфільтрати. Інфільтрати іноді зустрічалися і у товщі кістки альвеолярного відростка щелепи з формуванням довкола них лімфо-лейкоцитарного валіка і деструкцією самої кісткової тканини (рис. 4).

По мірі прогресування процесу запальні прояви посилювалися з нашаруванням на них деструктивних процесів та одночасним розвитком компенсаторних змін. Зміни деструктивного характеру проявлялися подальшим відшаруванням періодонтальної зв'язки, поглибленням періодонтальної кишені, а також вогнищевою резорбцією альвеолярної кістки. В епітелії спостерігалися зміни дистрофічного характеру, які проявлялися його потоншенням зі сторони ротової порожнини, зменшенням розмірів клітин та пікнозом їх ядер. Компенсаторні прояви характеризувалися розростанням грануляційної тканини в яснах з вогнищами акантозу епітелію з його потовщенням біля зуба та збільшенням розмірів його сосочків, що заглиблюються у підлеглу сполучну тканину у результаті проліферації. Одночасно спостерігалось розростання сполучної тканини (рис. 5-6).

Щодо кровоносних судин, то по мірі збільшення тривалості модельованої патології стінки їх артерій потовщувалися, а просвіт звужувався. Потовщення стінок артерій відбувалося як за рахунок набряку, так і за рахунок гіпертрофії самих гладком'язових клітин, що підтверджувалося збільшенням їх розмірів. Такі зміни у артеріях спрямовані на зменшення гемодинамічно-



Рисунок 6 – Гістологічна будова пародонта щура через 21 добу моделювання пародонтиту. Забарвлення гематоксилином і еозиним. Зб.: ×140. Позначення: 1 – кістка альвеолярного відростка щелепи, 2 – резорбція компактної кіркової частини альвеолярної кістки остеокластами, 3 – деструкція губчастої частини альвеолярної кістки на місці поліморфноклітинних інфільтратів, 4 – тканина зуба, 5 – періодонтальна зв'язка.

го навантаження на гемомікроциркуляторне русло. Однак, не зважаючи на це, гемодинамічні порушення приводили до розвитку периваскулярних набряків, які супроводжувалися потовщенням адвентиції судин за рахунок її розволокнення (рис. 7).

Іноді зустрічалися артерії з особливо потовщеними стінками, які нагадували артерії «замикаючого типу», що свідчить про їх активне функціональне навантаження за різних умов гемодинаміки (рис. 8). Для таких артерій характерною була наявність субінтимально розташованих пучків гладкої мускулатури поздовжнього спрямування, тобто так званих «поліпоподібних подушок», які здатні особливо інтенсивно впливати на швидкість і об'єм кровоплину (рис. 8). Відрізнити пучки поздовжньої гладкої мускулатури можна було по округлій формі зрізів їх ядер, так як при циркулярному розташуванні волокон їх ядра мають веретеноподібну форму.

Застосування методів корекції з використанням мезенхімальних стовбурових клітин людини мало позитивний вплив на перебіг модельованого патологічного процесу. Поступово редукувалися ті морфологічні зміни, які були характерними для пародонтиту. Тобто, відновлювалося нормальне кровопостачання тканин. Артерії були менш повнокровними, знижувався тонус їх стінок. У результаті цього поступово спадав набряк тканин, вони набували вихідних розмірів. Зменшувалися і поступово зникали поля поліморфноклітинної інфільтрації. За рахунок остеобластів відновлювалася структура кістки альвеолярного відростка щелепи. Зменшувалися розміри пародонтальної кишені, а то вони і зовсім закривалися в результаті повної адгезії слизової оболонки ясен до зуба, яка піднімалася по його поверхні догори (рис. 9).

До 21-ої доби більш повно відновлювалася морфологічна організація структурних компонентів пародонту. За рахунок гіперплазії слизова наповзала на зуб нерідко повністю редукуючи пародонтальні кишені (рис. 10).

#### Висновки.

1. При експериментальному відтворенні гострого пародонтиту мають місце деструктивні зміни епітелію та сполучнотканинної строми, порушення кровоплину, спостерігається запальна реакція в тканині ясен.

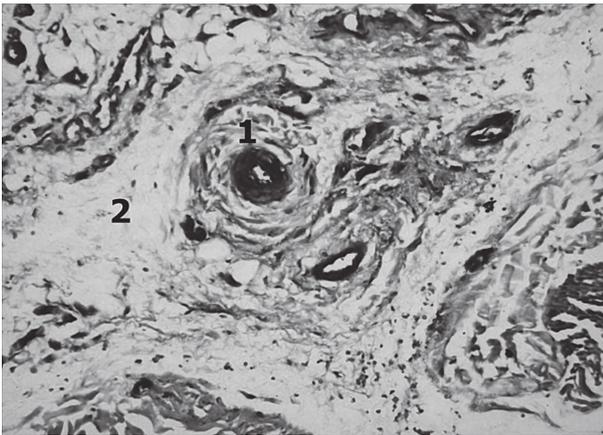


Рисунок 7 – Гістологічна будова пародонта щура через 21 добу моделювання пародонтиту. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.:  $\times 180$ . Позначення: 1 – артерія з потовщеною стінкою і звуженим просвітом та розволонненою адвентицією, 2 – периваскулярний набряк.

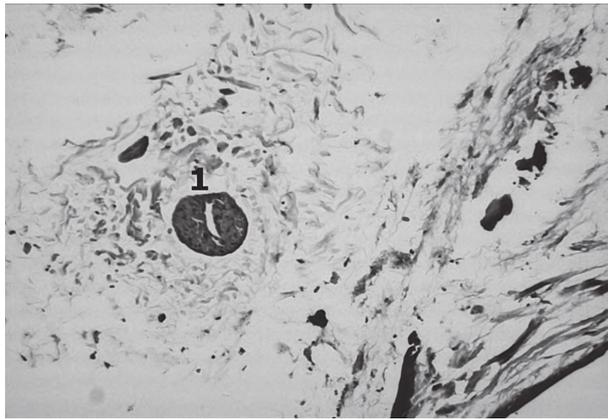


Рисунок 8 – Гістологічна будова пародонта щура через 21 добу моделювання пародонтиту. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.:  $\times 140$ . Позначення: 1 – артерія з потовщеною стінкою і звуженим просвітом та поздовжнім пучком субінтимально розташованої гладкої мускулатури.



Рисунок 9 – Гістологічна будова пародонта щура через 14 днів застосування мезенхімальних стовбурових клітин щура на тлі моделювання пародонтиту. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.:  $\times 140$ . Позначення: 1 – епітелій із частково збереженими явищами акантозу, 2 – сполучна тканина, 3 – періодонтальна зв'язка, 4 – тканина зуба.

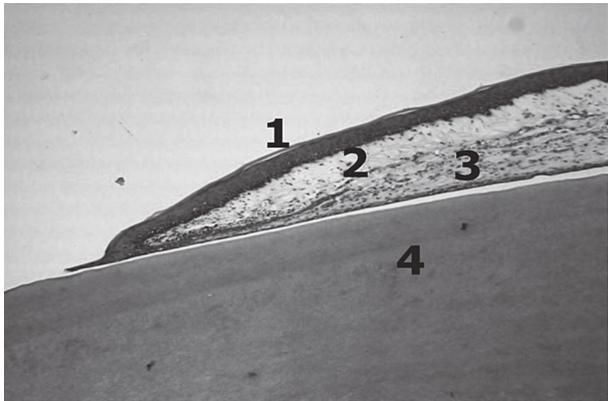


Рисунок 10 – Гістологічна будова пародонта щура через 21 добу застосування мезенхімальних стовбурових клітин людини на тлі моделювання пародонтиту. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.:  $\times 140$ . Позначення: 1 – повністю відновлена структура епітелію слизової оболонки ясен, 2 – помірно виражена сполучна тканина, 3 – звичайний вигляд періодонтальної зв'язки, 4 – тканина зуба.

2. Застосування методів корекції з використанням мезенхімальних стовбурових клітин людини мало позитивний вплив на перебіг модельованого патологічного процесу: поступово редукувалися ті морфологічні зміни, які були характерними для пародонтиту, відновлювалося нормальне кровопостачання тканин, поступово спадав набряк тканин, зменшувалися і поступово зникали поля поліморфноклітинної інфільтрації. За рахунок остеобластів відновлювалася структура кістки альвеолярного відростка щелепи. Зменшували-

ся розміри пародонтальної кишені, а у ряді випадків вони зовсім закривалися в результаті повної адгезії слизової оболонки ясен до зуба, яка піднімалася по його поверхні догори.

**Перспективи подальших досліджень.** У подальшому планується вивчення показників специфічної та неспецифічної резистентності організму у тварин з гострим пародонтитом та за корекції стовбуровими клітинами.

## Література

- Hodovana OI. Zakhvoryuvannya parodontu (hinhivit, parodontyt, parodontoz). Dzhura; 2009. 200 s. [in Russian].
- Zabolotnyy TD, Borysenko AV, Pupin TI. Zapal'ni zakhvoryuvannya parodontaabolotnyy. HalDent; 2013. 205 s. [in Ukrainian].
- Guzman YA, Sakellari D, Arsenakis M, Floudas CA. Proteomics for the discovery of biomarkers and diagnosis of periodontitis: a critical review. Expert review of proteomics. 2014 Feb 1;11(1):31-41.
- Thumbigere'Math V, Michalowicz BS, Hodges JS, Tsai ML, Swenson KK, Rockwell L, et al. Periodontal disease as a risk factor for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. Journal of periodontology. 2014 Feb;85(2):226-33.
- Hrudyanov AY, Syssoeva VYu, Ternovoy YuV. Stvolovye kletky y vozmozhnosty ykh prymerenyya v parodontolohyy. Stomatolohyya. 2012;91(1):71-5. [in Russian].
- Zolotukhyna EL. Stvolovye kletky u perspektyvy ykh prymerenyya v stomatolohyy u chelystnolytsevoy khyrurhyy. Molodoy uchenyy. 2014;9(6):145-7. [in Russian].
- Butenko HM, Kyryk VM. Reheneratyvna medytsyna i stovburovi klityny – problemy i rishennya. Zhurn. NAMN Ukrayiny. 2011;17(1):62-6. [in Ukrainian].
- Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morszeck C. Dental follicle stem cells and tissue engineering. Journal of oral science. 2010;52(4):541-52.
- Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. Journal of clinical periodontology. 1997 Sep;24(9):658-68.
- Guida L, Annunziata M, Carinci F, Di Feo A, Passaro I, Oliva A. In vitro biologic response of human bone marrow stromal cells to enamel matrix derivative. Journal of periodontology. 2007 Nov;78(11):2190-6.

11. Renard E, Lopez-Cazaux S, Guicheux J, Weiss P, Laboux O, Alliot-Licht B. Stem cells of dental pulp. *Comptes rendus biologies*. 2007 Aug 13;330(9):635-43.
12. Kozhem'yakin YuM, Khromov OS, Filonenko MA, Sayfetdinova HA. *Naukovo-praktychni rekomendatsiyi z utrymannya laboratornykh tvaryn ta roboty z nymy*. K.: Avitsena; 2002. 156 s. [in Ukrainian].
13. Bahriy MM, Dibrova VA, Popadynets' OH, Hryshchuk IM. *Metodyky morfolohichnykh doslidzhen'*: monohrafiya. Vinnytsya: Nova knyha; 2016. 238 s. [in Ukrainian].

## ЗМІНИ СТРУКТУРИ КОМПОНЕНТІВ ПАРОДОНТА ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ГОСТРОГО ПАРОДОНТИТУ У ЩУРІВ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ

Бігуляк Г. Т., Кліщ І. М.

**Резюме.** Метою нашого дослідження було визначення особливостей морфологічних змін компонентів пародонту при змодельованому гострому пародонтиті та його корекція стовбуровими клітинами. Проаналізовано результати гістологічного дослідження тканин пародонту тварин з гострим експериментальним пародонтитом, який коригували за допомогою мезенхімальних стовбурових клітин людини. Залежно від лікування тварин поділили на 4 групи: 1 група – тварини без патології (інтактні); 2-й – тварини з змодельованим гострим пародонтитом; 3-й – тварини з пародонтитом, коригованим мезенхімальними стовбуровими клітинами. Матеріал для гістологічного дослідження отримували на 1-шу, 7-му, 14-ту та 21-шу доби після виведення тварин з експерименту. Матеріалом для морфологічних досліджень були тканин пародонта. Для цитологічного дослідження мазки відбитки фарбували за Романовським-Гімзою. Для фотодокументації зображення з гістологічних препаратів виводили на монітор комп'ютера за допомогою мікроскопа Nikon eclipse C та цифрової відеокамери (Digital Camera SCMOS) за допомогою програмного забезпечення TouPView. За результатами дослідження встановлено, що при експериментальному моделюванні гострого пародонтиту були присутні деструктивні зміни в епітелії та стромі сполучної тканини, порушення кровотоку, запальна реакція в тканині ясен. Корекція мезенхімальними стовбуровими клітинами позитивно впливає на перебіг змодельованого патологічного процесу. Морфологічні зміни, характерні для пародонтиту, поступово зменшувалися, тобто відновлювалося нормальне кровопостачання тканин, артерії були менш повнокровними, тонус їх стінок знижувався. Внаслідок цього набряк тканин поступово зменшувався, набуваючи початкових розмірів. Поля поліморфно-ядерної інфільтрації зменшувалися і поступово зникали. Остеобласти сприяли відновленню кісткової структури альвеолярного відростка щелепи. Розмір пародонтальної кишені зменшився, а на окремих ділянках він повністю закритися в результаті повного зчеплення слизової оболонки ясен із зубом, який піднімався його поверхнею догори.

**Ключові слова:** гострий експериментальний пародонтит, стовбурові клітини, регенерація.

## CHANGES IN THE STRUCTURE OF PERIODONTAL COMPONENTS IN THE MODELING OF ACUTE PERIODONTITIS IN RATS AND ITS CORRECTION BY STEM CELLS

Biguliak H. T., Klishch I. M.

**Abstract.** The aim of our research was to study peculiar features of morphological changes in the components of the periodontium in the modelled acute periodontitis and its correction by stem cells. The results of histological study of periodontal tissues of the animals with acute experimental periodontitis, which was corrected using human mesenchymal stem cells were analysed. Depending on the treatment, the animals were divided into 4 groups: the 1<sup>st</sup> group – the animals without pathology (intact); the 2<sup>nd</sup> – the animals with modelled acute periodontitis; the 3<sup>rd</sup> – the animals with periodontitis corrected by human mesenchymal stem cells. The material for histological study was obtained on the 1<sup>st</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days after taking the animals out of the experiment. Periodontal tissues of the animals were used as the material for morphological studies. For photo documentation, the images of histological specimens were displayed on a computer monitor using a Nikon Eclipse C microscope and a SCMOS Digital Camera by means of TouPView. In the experimental modelling of acute periodontitis the destructive changes in the epithelium and connective tissue stroma, impaired blood flow, inflammatory response in the gum tissue were present. According to the results of the research, it was established that correction by human mesenchymal stem cells positive effect on a course of the modeled pathological process. The morphological changes characteristic of periodontitis gradually reduced, i.e. the normal blood supply to the tissues restored, the arteries were less full-blooded, the tone of their walls decreased. Consequently, the swelling of the tissues gradually decreased becoming of original size. The polymorphonuclear infiltration fields decreased and gradually disappeared. Osteoblasts promoted restoration of the bone structure of the jaw alveolar process. The size of the periodontal pocket decreased, and in some areas it fully closed as a result of complete adhesion of the mucous membrane of the gums to the tooth, which rose on its surface upwards.

**Key words:** acute experimental periodontitis, stem cells, regeneration.

### ORCID and contributionship:

Biguliak H. T.: 0000-0002-2137-4859 <sup>BCDE</sup>

Klishch I. M.: 0000-0001-6226-4296 <sup>AF</sup>

### Conflict of interest:

The Authors declare no conflict of interest.

---

### Corresponding author

Biguliak Halyna Teodorivna

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University

Ukraine, 46001, Ternopil, 1 Maydan Voli str.

Tel: 0987515333

E-mail: bigulyak@tdmu.edu.ua

---

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article.

Received 01.12.2021

Accepted 07.05.2022